

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Veronika Šimšová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**BIOAKTIVNÍ LÁTKY OBSAŽENÉ VE VÝLISCÍCH Z
ČERNÉHO BEZU**

BIOACTIVE SUBSTANCES CONTAINED IN ELDERBERRY POMACE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Šimšová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1118/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Veronika Šimšová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Bioaktivní látky obsažené ve výliscích z černého bezu

Zadání bakalářské práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná charakteristika rostlinného druhu *Sambucus nigra*
- 2) Biologicky aktivní látky obsažené v plodech černého bezu, využití tohoto ovoce
- 3) Celková sušina a postupy jejího stanovení
- 4) Stanovení vitamínu C manuálními metodami

Experimentální část:

- 1) Příprava výlisků a šťávy z bezinek
- 2) Příprava extraktů z bezinkových výlisků
- 3) Stanovení vybraných chemických charakteristik v připraveném extraktu a bezinkové šťávě
- 4) Zpracování získaných dat a interpretace výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Veronika Šimšová
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením vybraných chemických charakteristik v extraktu z výlisků, ve šťávě a v kompotu z bezu černého (*Sambucus nigra L.*).

V teoretické části je popsána botanická charakteristika bezu černého včetně jeho rozšíření, možnosti využití jednotlivých částí bezu v potravinářství a v léčitelství a chemické složení plodů bezu černého. Velká část je věnována bioaktivním látkám obsaženým v těchto plodech. Druhá kapitola pojednává o sušině a metodách jejího stanovení. V poslední kapitole teoretické části je popsán vitamín C, jeho význam pro organismus a manuální metody stanovení tohoto vitamínu.

Mezi vybrané chemické charakteristiky stanovené v experimentální části bylo zařazeno stanovení obsahu redukujících cukrů gravimetrickou metodou a metodou podle Berthrandu, titrovatelných kyselin, celkových anthokyanových barviv pH-diferenciální metodou, celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteu a stanovení sušiny sušením do konstantní hmotnosti a refraktometrickou metodou.

Analýzy prokázaly, že extrakty z výlisků bezu černého připravené za vhodných podmínek, mají ve většině případů chemické charakteristiky srovnatelné s bezinkovou šťávou a kompotem. V případě anthokyanových a fenolických látek jsou extrakty z výlisků mnohonásobně lepším zdrojem než bezinková šťáva a kompot.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bez černý (*Sambucus nigra L.*), bezové výlisky, sušina, redukující cukry, titrovatelné organické kyseliny, anthokyany, fenolické látky.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the determination of selected chemical characteristics in the elderberry juice, compote and in the extracts of elderberry marc.

The theoretical part describes the botanical characteristics of elderberry (*Sambucus nigra L.*) including its occurrence, the possibility of utilization of individual parts of the plant in the food industry and in the healing therapies and chemical composition of the berries. The biggest attention is given to the bioactive compounds contained in these fruits. The second chapter deals with the dry matter and the methods of its determination. The last chapter of the theoretical part describes vitamin C, its importance for the human organism and manual methods for determination of vitamin C.

Among the selected chemical characteristics, set out in the experimental part, was the determination of reducing sugars by gravimetric method and Berthrand method, titratable acids, total anthocyanins by pH-differential method, total phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method and determination of the dry matter by drying and refractometric method.

Analyzes have proven that extracts made of elderberry marc under suitable conditions have, in most cases, chemical characteristics comparable to the elderberry juice and compote. However, extracts are much better source of anthocyanic and phenolic compounds than juice and compote.

KEY WORDS

Elderberry (*Sambucus nigra L.*), elderberry marc, dry matter, reducing sugars, titratable organic acids, anthocyanins, phenolic compounds.

ŠIMŠOVÁ, V. *Bioaktivní látky obsažené ve výliscích z černého bezu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 46 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za vstřícný přístup, trpělivé vedení a poskytnutí cenných rad v průběhu řešení této bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala svým blízkým za podporu poskytovanou během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Druhy rodu Sambucus	10
2.2	Bez černý	10
2.2.1	Taxonomické zařazení.....	10
2.2.2	Botanická charakteristika	10
2.2.3	Využití v léčitelství	11
2.2.4	Využití v potravinářství.....	12
2.2.5	Obsah látek v plodech a květech bezu	13
2.2.5.1	Cukry.....	13
2.2.5.2	Organické kyseliny	13
2.2.5.3	Anthokyany	13
2.2.5.4	Třísloviny	14
2.2.5.5	Vitamíny	15
2.2.5.6	Minerální látky	16
2.3	Sušina.....	17
2.3.1	Gravimetrické metody stanovení sušiny	18
2.3.2	Destilační metody stanovení sušiny	19
2.3.3	Optické metody stanovení sušiny.....	19
2.3.4	Další možnosti stanovení	19
2.4	Vitamín C	20
2.4.1	Chemická a strukturní charakteristika.....	20
2.4.2	Význam pro organismus člověka	21
2.4.3	Manuální metody stanovení vitamínu C	21
2.4.3.1	Spektrofotometrické metody.....	21
2.4.3.2	Titrační metody	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Laboratorní vybavení.....	23
3.1.1	Pomůcky.....	23
3.1.2	Chemikálie	23
3.1.3	Přístroje	23
3.2	Příprava organického materiálu.....	24

3.3	Příprava extraktů z bezinkových výlisků.....	24
3.4	Stanovení sušiny sušením při 105 °C	24
3.5	Stanovení refraktometrické sušiny	25
3.6	Stanovení redukujících cukrů	25
3.6.1	Příprava vzorků	25
3.6.2	Gravimetrická metoda	25
3.6.2.1	Postup stanovení	25
3.6.2.2	Výpočet	25
3.6.3	Metoda podle Berthrande	26
3.6.3.1	Standardizace odměrného roztoku manganistanu draselného	26
3.6.3.2	Postup stanovení	26
3.6.3.3	Výpočet	26
3.7	Stanovení pH a obsahu titrovatelných kyselin	26
3.7.1	Příprava odměrného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,25 mol · l ⁻¹ ..	26
3.7.2	Standardizace odměrného roztoku hydroxidu draselného	27
3.7.3	Příprava vzorků a postup stanovení	27
3.7.4	Výpočet	27
3.8	Stanovení celkových anthokyanových látek pH-diferenciální metodou	27
3.8.1	Příprava pufru chloridu draselného o koncentraci 0,025 mol · l ⁻¹ a pH 1,0	27
3.8.2	Příprava pufru octanu sodného o koncentraci 0,4 mol · l ⁻¹ a pH 4,5.....	28
3.8.3	Příprava vzorků a postup stanovení	28
3.8.4	Výpočet	28
3.9	Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteu	29
3.9.1	Příprava 7,5% roztoku uhličitanu sodného	29
3.9.2	Příprava vzorků a postup stanovení	29
3.9.3	Výpočet	29
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
4.1	Stanovení sušiny	30
4.2	Výběr nejvýhodnější extrakce	30
4.3	Stanovení refraktometrické sušiny	32
4.4	Stanovení redukujících cukrů	32
4.5	Stanovení pH a obsahu titrovatelných kyselin	33
4.6	Stanovení celkových anthokyanových barviv	34

4.7	Stanovení celkových fenolických látek	35
5	ZÁVĚR.....	37
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	41
8	SEZNAM PŘÍLOH	42
9	PŘÍLOHY	43

1 ÚVOD

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je od pradávna využíván jako léčivá rostlina. Jedná se o rozložitý bíle kvetoucí keř, na kterém na konci léta dozrávají černofialové plody zvané bezinky. V současné době tato rostlina nabývá stále většího významu díky širokým možnostem jejího využití nejen v léčitelství, ale také v potravinářském průmyslu.

Květy bezu černého jsou tradičně používány pro přípravu čajů, které působí proti nachlazení. Často jsou také květy využívány pro výrobu sirupů nebo domácích kvašených limonád.

Plody této rostliny bývají používány pro výrobu marmelád, kompotů, džusů a vína. Bezinky dle současných průzkumů vykazují kromě léčivých účinků také významné antioxidační účinky. To je způsobeno jednak obsahem vitamínu C a také anthokyanovými látkami. Díky vysokému obsahu anthokyanových pigmentů je možné plody bezu nebo bezinkovou šťávu použít jako přírodní barvivo v různých potravinářských produktech, např. v džusech, jogurtech nebo sirupech.

Původně se bez černý vyskytoval pouze ve vlhkých listnatých či smíšených nivních lesích nebo v křovinách a na pastvinách. Díky nízkým nárokům na životní prostředí se však snadno rozšířil a nyní jej můžeme nalézt i ve městech. Od druhé poloviny 20. století je prováděno cílené šlechtění odrůd bezu černého, které má za úkol získat odrůdy s co nejlepšími charakteristikami pro potravinářské zpracování. Šlechtěný černý bez je ve větším množství pěstován v Rakousku, Dánsku, Maďarsku nebo na Slovensku. Česká republika patří mezi státy s menší produkcí.

Cílem této bakalářské práce bylo provést stanovení vybraných chemických charakteristik extraktů z výlisků bezu černého a porovnat je s chemickými charakteristikami bezinkové šťávy a kompotu. Mezi stanovované chemické charakteristiky byl vybrán obsah sušiny, obsah titrovatelných kyselin, obsah redukujících cukrů a obsah anthokyanových a fenolických látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Druhy rodu *Sambucus*

Botanické klíče uvádějí z obou polokoulí na 40 druhů bezů, převážně ve formě opadavých keřů, popřípadě stromů nebo vytrvalých bylin. V Evropě se přirozeně setkáváme se třemi druhy, které lze nalézt ve městech, na venkově, v lesích i v horách. Jedná se zejména o bez černý (*Sambucus nigra*), který je od nepaměti využíván v lidovém léčitelství. V listnatých i jehličnatých lesích a na jejich pasekách roste bez červený, respektive hroznatý (*Sambucus racemosa*), který se vyznačuje hroznovitým plodenstvím červené barvy. V teplejších pahorkatinách a podhorských oblastech se můžeme setkat s jedovatým bezem chebdlí (*Sambucus ebulus*), který není dřevina, ale bylina. [1]

Dalším zástupcem rodu *Sambucus* je bez kanadský. Původně pochází ze Severní Ameriky, kde roste volně podél plotů. V Evropě je tato rostlina rozšířená převážně jako okrasná zahradní rostlina. [2]

2.2 Bez černý

2.2.1 Taxonomické zařazení

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Nadoddělení: semenné rostliny (*Spermatophyta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: nižší dvouděložné (*Magnoliopsida*)

Podtřída: *Asteridae*

Řád: štětkotvaré (*Dipsacales*)

Čeleď: zimolezovité (*Caprifoliaceae*)/pižmovkovité (*Adoxaceae*)/ bezovité (*Sambucaceae*)

Rod: bez (*Sambucus*)

Druh: bez černý (*Sambucus nigra* L.) [1, 3, 4]

2.2.2 Botanická charakteristika

Bez černý je opadavý keř nebo malý strom. Dorůstá do výšky 3–8 m a průměru kmene až 40 cm. Má bradavičnatou šedohnědou borku a mladé větve jsou hojně pokryty lenticelami. [5] Letorosty jsou dužnaté a sytě zelené a houbovitá dřevina větví, zvaná bezová duše, je bílé barvy. Vstřícné listy, které po rozemnutí nepříjemně páchnou, jsou lichozpeřené, většinou s pěti vejčitými, 5–10 cm dlouhými pilovitými lístky. Drobné žlutavě bílé a silně vonící květy s pětičetnou kolovitou korunou jsou uspořádány v deštníkovitých vrcholičnatých latách o velikosti 10–25 cm s pěti hlavními paprsky. Toto květenství bývá označováno jako kosmatice a v plném květu bývá od června do července. Plody, známé jako bezinky, jsou kulaté trojsemenné peckovičky velké 6–8 mm. Dozrávají od srpna do září a v plné zralosti mají černou až černofialovou barvu s purpurově červenou šťavnatou dužinou. [2, 6, 7, 8]

Tento druh patří mezi nejrozšířenější z rodu *Sambucus*. Je rozšířen téměř po celé Evropě a Malé Asii až do Západní Sibíře. S oblibou roste na výživných humusových půdách až do výšek 1600 m n. m. Původně se vyskytoval zejména v nivních lesích, vlhkých listnatých

a smíšených lesích, v křovinách, na pastvinách či rumišťích a často byl vysazován u venkovských stavení jako léčivá bylina. Avšak díky tomu, že černý bez je velmi životaschopná nitrofilní rostlina a jeho semena jsou snadno roznášena ptáky, se dnes vyskytuje hojně i v parcích, zanedbaných zahradách či na skládkách. [2, 6]

2.2.3 Využití v léčitelství

Již známí přírodovědci a léčitelé starého Řecka a Říma používali černý bez k léčebným účelům. O významu bezu v léčitelství svědčí také staré úsloví „Před heřmánkem smekni, před bezem klekni.“. [2]

Květenství se v době květu odstřihují a suší se zavěšená na šňůrkách. Květenství poskytují drogu *Flos sambuci*. Ta má nažloutlou barvu, silný charakteristický pach a nasládlou chuť. Obsahuje glykosidy, sliz, silice, třísloviny, organické kyseliny, látky s fytoncidním účinkem aj.

Květní droga je součástí řady léčivých čajů, používaných především při nemocech z nachlazení. Významný je zejména potopudný účinek. Dále má droga účinky slabě uklidňující, antineuralgické, močopudné a projímavé. [2]



Obrázek 1: Květy bezu černého [9]

Pro domácí použití i potřeby potravinářského průmyslu jsou sbírána také plodenství, která poskytují drogu *Fructus sambuci*. Suší se nejprve na slunci a poté se dosoušejí umělým teplem až do úplného scvrknutí a svaštění plodů, které se pak sdrhnou ze stopek. Usušené plody mají leskle černofialovou barvu, jsou bez pachu a mají obvykle nakysle sladkou, poněkud svíravou chuť. Droga obsahuje glykosidy, anthokyany, karoteny, vitamin C, B, cholin aj.

Plody jsou s oblibou používány při bolestivých onemocněních nervového původu, např. při zánětu trojklanného nervu, migrénách a jako protikřečový prostředek. [2]



Obrázek 2: Plody bezu černého [10]

2.2.4 Využití v potravinářství

Dříve byla šťáva z plodů používána k dobarvování vín. [5] Plody jsou často používány v léčitelství, připravuje se z nich tmavorudé bezinkové víno a dnes slouží i jako surovina pro průmyslovou výrobu kompotů, džemů, sirupů apod. Koncentrát z bezinkové šťávy je žádaným potravinářským barvivem přírodního původu. [2] Květy lze využít pro výrobu sirupu, kvašené limonády nebo čaje. [11]



Obrázek 3: 100% pasterovaná bezinková šťáva [12]

2.2.5 Obsah látek v plodech a květech bezu

Plody bezu černého jsou dobrým zdrojem, vlákniny, vitamínů a minerálních látek. Přesné složení se však liší v závislosti na odrůdě, zralosti, způsobu pěstování nebo klimatických podmínkách. [13]

Tabulka 1: Obsah nutričních látek v čerstvých plodech bezu černého [13, 14]

sušina	20,2 %
proteiny	2,8 %
lipidy	0,6 %
sacharidy	18,4 %
cukry	8,8 %
vláknina	7,4 %
popel	0,9 %

Bezinky také obsahují velké množství biologicky aktivních látek jako jsou antioxidanty, anthokyany, fenolické látky, organické kyseliny atd. [15]

2.2.5.1 Cukry

Obsah cukrů, které se běžně vyskytují v ovoci, je v plodech černého bezu poměrně nízký. Průměrný obsah jednotlivých cukrů je možné vidět v Tabulce 2. Pro technologické zpracování však není nízký obsah cukrů limitující, protože je lze přidávat do konečného produktu. [3]

Tabulka 2: Průměrná koncentrace cukrů v plodech černého bezu [$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$] [16]

sacharóza	fruktóza	glukóza	cukry celkem
$1,04 \pm 0,10$	$43,96 \pm 1,29$	$42,62 \pm 1,18$	$87,62 \pm 2,48$

2.2.5.2 Organické kyseliny

Vysoký obsah organických kyselin je důležitý při technologickém zpracování, protože je nelze na rozdíl od sacharidů přidávat do konečného produktu. V plodech černého bezu byly identifikovány čtyři organické kyseliny – citronová, jablečná, šikimová a fumarová. Ty jsou v plodech průměrně zastoupeny v množství, které udává Tabulka 3. [16]

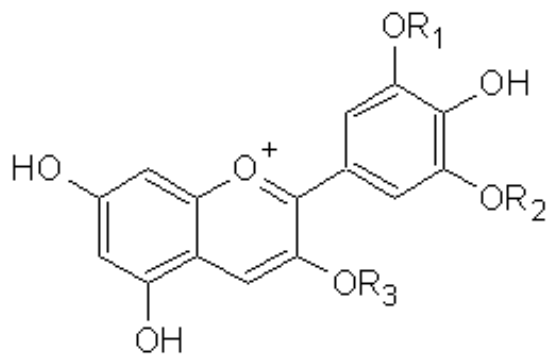
Tabulka 3: Průměrná koncentrace organických kyselin v plodech černého bezu [$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$] [16]

kyselina citronová	kyselina jablečná	kyselina šikimová	kyselina fumarová	kyseliny celkem
$3,50 \pm 0,14$	$1,10 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,01$	$5,10 \pm 0,150$

2.2.5.3 Anthokyany

Anthokyany patří do skupiny flavonoidů. Jedná se o glykosidická barviva nacházející se v rostlinných buňkách. V kyselých roztocích jsou anthokyany zbarvené červeně, zatímco

v zásaditém prostředí jsou modré. Všechny anthokyanové látky jsou odvozeny ze základní struktury anthokyanidinu. [17]



Anthokyanidin

Tyto látky jsou zodpovědné za barvu mnoha druhů květin, ovoce a zeleniny, od oranžové až po modrou. Významně také indikují kvalitu ovoce, protože ovlivňují jak vzhled, tak chuť. V průmyslu nacházejí uplatnění nejen jako potravinářská barviva, ale i jako antioxidační činidla. Anthokyaniny, stejně jako jiné flavonoidy, vykazují protirakovinné, antibakteriální, protialergenní a antivirotické účinky. Působí také stimulačně na imunitní systém. [16]

Dosud bylo v přírodních zdrojích identifikováno asi 300 různých druhů anthokyanů. [18] V plodech černého bezu byla zjištěna přítomnost pěti druhů, které jsou odvozeny od jednoho anthokyanidinu. [16, 18] Jejich obsah je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4: Průměrná koncentrace anthokyanů v plodech černého bezu [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$] [16]

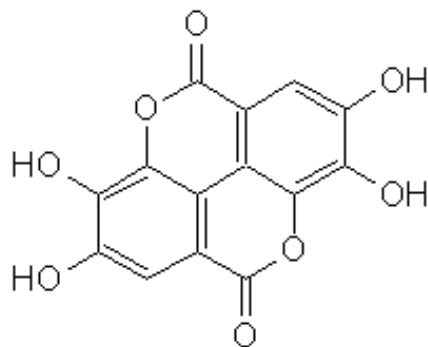
cyanidin 3-sambubiosid-5-glukosid	cyanidin 3,5-diglukosid	cyanidin 3-sambubiosid	cyanidin 3-glukosid	cyanidin 3-rutinosid	anthokyaniny celkem
$30,77 \pm 2,61$	$14,34 \pm 1,33$	$438,80 \pm 31,20$	$376,20 \pm 27,40$	$3,77 \pm 0,62$	$863,80 \pm 49,90$

2.2.5.4 Třísloviny

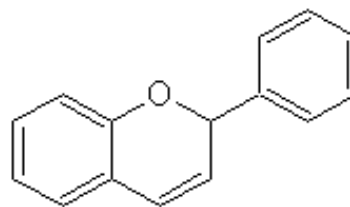
Třísloviny neboli tanniny jsou primární příčinou trpké nebo svíravé chuti. Proteiny obsažené ve slinách v důsledku interakce s těmito látkami denaturují. Dochází tak ke ztrátě jejich ochranného vlivu a k následné interakci tříslovin s proteiny ústní dutiny. Jako přirozené složky potravin mají značný význam, protože často ovlivňují žádoucí i nežádoucí chuťové vlastnosti potravin. U některých nápojů mohou vznikat zákaly a sedimenty, na jejichž vzniku se podílí přítomné proteiny a třísloviny. V takových případech se třísloviny odstraňují za použití aditivních látek, např. želatiny, polyamidů nebo polyvinylpolypyrrolidonu.

Třísloviny dělíme na dvě skupiny látek – hydrolyzovatelné třísloviny a kondenzované třísloviny. Vyskytují se však také prakticky libovolné kombinace kondenzovaných a hydrolyzovatelných tříslovin, které se nazývají komplexní třísloviny. Hydrolyzovatelné třísloviny jsou polymery esterů kyseliny gallové neboli polygalloylestery. Jsou používány v potravinářském průmyslu jako čeridla k prevenci vzniku bílkovinných zákalů. Kondenzované třísloviny, nazývané také proanthokyanidiny, jsou strukturně velmi rozmanité oligomery a polymery některých flavonoidních látek se strukturou flavanu. Mají různé fyziologické

účinky, např. protizánětlivé, protialergické. Také blahodárně působí při prevenci vzniku aterosklerózy. [19]



kyselina ellagová



flavan

2.2.5.5 Vitamíny

Vitamíny jsou organické nízkomolekulární látky s rozdílnou chemickou strukturou. Nejsou zdrojem energie ani stavebním materiálem, ale vesměs hrají významnou roli jako součást katalyzátorů biochemických reakcí. Proto bývají často označovány jako exogenní esenciální biokatalyzátory. [19] Lidské tělo si většinu vitamínů nedokáže vytvářet samo. Jsou proto důležitou součástí naší potravy. Každý vitamín plní v těle několik důležitých úkolů a nedostatek kteréhokoli z nich může vést k vážnému onemocnění. [2] Nejběžnější rozdělení vitamínů je podle rozpustnosti v polárním prostředí (ve vodě) a v nepolárním prostředí (v tucích). Mezi vitamíny rozpustné ve vodě patří vitamíny B-komplexu a vitamín C. Vitamíny rozpustné v tucích jsou A, D, E a K. [19] Plody černého bezu jsou dobrým zdrojem některých vitamínů, viz Tabulka 5.

Tabulka 5: Obsah vitamínů v čerstvých plodech černého bezu [$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$] [15]

A (Retinol)	0,030
B1 (Thiamin)	0,070
B2 (Riboflavin)	0,060
B3 (Niacin)	0,050
B5 (Kyselina pantothenová)	0,140
B6 (Pyridoxin)	0,230
B9 (Kyselina listová)	0,006
C (Kyselina L-askorbová)	36,000

Vitamín A, nebo také retinol, se uplatňuje především v biochemii zrakového vjemu a při biosyntéze bílkovin, respektive diferenciaci buněk. [19] Účastní se také udržování dobrého stavu sliznic dýchacího, zažívacího a močového ústrojí. Kromě toho je velmi důležitý pro správný vývoj lidského plodu. [2] Avitaminóza se projevuje poruchami vidění (šeroslepost), inhibicí růstu, deformacemi kostí a reprodukčních orgánů. [19] Vyvolává také suchost sliznic a zvyšuje tak riziko infekce. [2]

Thiamin je vitamín patřící do skupiny vitamínů B. V různých orgánech je esterifikován na thiamindifosfát, který je kofaktorem významných enzymů souvisejících především s metabolismem sacharidů a aminokyselin. Deficit tohoto vitamínu se projevuje nespecifickými příznaky jako je svalová únava, nechutenství, hubnutí a podrážděnost. Avitaminóza vede k neurologickému onemocnění zvanému *beri-beri*. [19]

Riboflavin neboli vitamín B2 je kofaktorem enzymů účastnících se především dýchacího řetězce. [13] Je tedy životně důležitý pro uvolňování energie z potravy. Je nezbytný pro růst a celkový vývoj. [2] Deficience zvaná ariboflavinosa je poměrně vzácná. Projevuje se hlavně zánětlivými změnami kůže (dermatitidami) a sliznic. [19]

Niacin je společným označením pro kyselinu nikotinovou a niacinamid, které vykazují stejnou biologickou aktivitu. Niacinamid je součástí koenzymu NAD a jeho fosforečného esteru NADP, které jsou kofaktory několika set různých enzymů, jež se podílí na tvorbě energie v buňkách. Je také potřebný k tvorbě neurotransmiterů a pomáhá udržovat zdravou pokožku. Člověk má významnou, ale omezenou možnost syntetizovat niacin z tryptofanu. Nedostatek vitamínu, tzv. pelagra, se projevuje zejména kožními chorobami, poruchami funkce trávicího ústrojí a později také mentálními poruchami. [2, 19]

Kyselina pantothenová je nezbytná pro metabolismus sacharidů, proteinů i lipidů. Je prekurzorem koenzymu A uplatňujícím se v průběhu glukogeneze, při uvolňování energie ze sacharidů, při syntéze a degradaci mastných kyselin, sterolů a dalších látek. Kyselina pantothenová je také nezbytná pro normální funkci epitelů. [20]

Pyridoxin je kofaktorem enzymů, které se účastní reakcí souvisejících s metabolismem bílkovin. Je také lapačem volných radikálů. Nedostatek se projevuje u dospělých poruchami periferního nervového systému, kůže a sliznic. U dětí může vlivem nedostatku pyridoxinu dojít k postižení centrální nervové soustavy.

Kyselina listová je po vstřebání redukována na tetrahydrofolát (THF), který hraje významnou roli v biosyntéze DNA, snižuje riziko postižení DNA a působí proti replikačním chybám. [20] Tato látka je v současné době ve výživě nedostatková. Deficience se projevuje anémií (především v těhotenství a u starších osob). [19]

Vitamín C a jeho vliv na organismus člověka je popsán v samostatné kapitole níže.

2.2.5.6 Minerální látky

Minerální látky v potravinách většinou definujeme jako prvky obsažené v popelu potravin, respektive jako prvky, které zůstávají ve vzorku potravin po úplné oxidaci organického podílu na oxid uhličitý, vodu aj. Bezinky jsou poměrně bohatým zdrojem některých minerálních látek, viz Tabulka 6. [19]

Tabulka 6: Obsah minerálních látek v čerstvých plodech černého bezu [$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$] [14]

K	391,33
P	54,00
Ca	28,06
Na	2,17
Mg	25,99
Fe	1,86
Zn	0,36
Mn	0,27
Cu	0,14

Draslík a sodík mají spolu s chloridem jako protiiontem za úkol udržovat osmotický tlak tekutin vně i uvnitř buněk a acidobazickou rovnováhu. Draslík dále významným způsobem ovlivňuje svalovou aktivitu, zejména aktivitu srdečního svalu. Také vyrovnává nepříznivé účinky nadměrného příjmu sodíku, jako jsou například otoky a vysoký krevní tlak. Dlouhodobý nadbytek těchto dvou prvků může vést k hypertenzi a v krajním případě až k selhání srdce. Nedostatek sodíku a draslíku může vyvolat svalovou slabost, apatii, nepravidelnou srdeční činnost a poruchu ledvin. [2, 19]

Fosfor jako esenciální prvek vystupuje v živé hmotě v řadě funkcí. Jeho sloučeniny jsou hlavní složkou tkání všech rostlinných i živočišných buněk. Dále zastává funkci v energetickém metabolismu nebo funkce aktivační, regulační a katalytické. V těle dospělého člověka se čtyři pětiny fosforu nachází v kostech a zubech. Nedostatek fosforu je velmi vzácný, protože tento prvek je obsažen ve velkém množství téměř ve všech potravinách. [2, 19]

Vápník je z kvantitativního hlediska hlavní minerální složkou lidského těla. Je nezbytnou součástí kostí a zubů, které obsahují 99 % z celkového množství tohoto prvku v těle. Zbylé 1 % hraje významnou roli při stavbě buněk a srážení krve. Hořčík je taktéž významnou složkou kostí – obsahují 60 % z celkového množství hořčíku v těle. Oba prvky zastávají řadu významných biochemických funkcí. Společně ovlivňují permeabilitu biologických membrán a dráždivost buněk. Hořčík je nezbytný pro všechny metabolické děje, při kterých se tvoří nebo hydrolyzuje ATP. Účastní se také stabilizace molekul DNA. Vápník se významně podílí na svalové a nervové činnosti. Nedostatek hořčíku v kombinaci s nadbytkem vápníku vede ke zvýšení dráždivosti. Velký nadbytek hořčíku vede naopak k útlumu nervové soustavy. [2, 19]

2.3 Sušina

Obsah sušiny v potravinách souvisí s obsahem vody. Pojmem sušina se označuje souhrn všech organických a anorganických složek obsažených v potravine, kromě vody. Celková sušina je součet rozpustné a nerozpustné sušiny. Stanovuje se nejčastěji sušením do konstantní hmotnosti. Rozpustná sušina je součet organických a anorganických látek rozpustných ve vodě (cukry, kyseliny, třísloviny, barviva, některé vitaminy, dusíkaté a minerální látky). Stanovuje se z rozdílu celkové a nerozpustné sušiny, nebo přímo refraktometricky, hustoměry, pyknometricky apod. Nerozpustná sušina zahrnuje organické a anorganické látky nerozpustné

ve vodě (pektiny, celulosu, hemicelulosa, bílkoviny, tuky, minerální látky apod.). Stanovuje se stejnými metodami, jako rozpustná sušina. [21]

Obsah vody (vlhkost, sušina) patří mezi nejčastěji sledované a zároveň nejobtížnější (co do přesnosti a správnosti) stanovitelné ukazatele jakosti potravin. Pro stanovení se používá řada fyzikálních, fyzikálně-chemických a chemických metod. Metody dělíme na přímé a nepřímé, přičemž přímé metody pro stanovení vody jsou současně metodami nepřímými pro stanovení sušiny a naopak. [22]

2.3.1 Gravimetrické metody stanovení sušiny

Odstranění vody probíhá za zvýšených teplot za definovaných podmínek ohřevu nebo naopak lyofilizací za sníženého tlaku a teploty a následného zjištění úbytku hmotnosti. Nejobvyklejší metodou je stanovení sušiny sušením do konstantní hmotnosti při 105 °C v sušárně bez nebo s nuceným oběhem sušícího média. [22]

Pro provozní účely jsou však upřednostňovány rychlometody, kdy je sušení prováděno při vyšších teplotách a čas stanovení je tak výrazně zkrácen. Rychlometody poskytují méně přesné, avšak pro provozní účely plně dostačující výsledky. [23] U masných výrobků se používá teplota sušení 170 °C, u mlékárenských a pekárenských výrobků 130 °C. Další možností, jak proces sušení urychlit, je smíchání vzorků s inertním materiálem, např. mořským pískem, sušení v tenké vrstvě nebo přidání malého množství ethanolu. [22] Velmi rychlé stanovení (obvykle 5–30 minut) poskytuje sušení infrazářiči. [23] Výhodou je také možnost regulace teploty nastavením vzdálenosti lampy od vzorku při osvětlení shora, zdola nebo z obou stran. Rychlost odpařování vody je možné zvýšit také přerušovaným ozařováním. Výrazně kratší časy stanovení při dosažení srovnatelné nebo lepší přesnosti poskytuje aplikace mikrovlnné energie. K odpařování vody dochází při nižší teplotě, takže se zabrání přepalování a degradaci vzorků. Vzorky, které je obtížné nebo nemožné sušit pomocí infrazářičů (materiály na bázi cukrů), je možné tímto způsobem sušit bez problémů. [22]

Většina výše popsaných postupů umožňuje plnou automatizaci stanovení. Při spojení s elektronickými vahami a případně i vakuovou technikou tato zařízení zaručují dosažení mimořádné správnosti a přesnosti stanovení. [22]

Při vysokých teplotách často dochází k nežádoucím chemickým reakcím, které mohou vést ke zkreslení výsledků. Pro tyto typy vzorků se používá dehydratace za snížené teploty. V případě, kdy je potravinu termolabilní nebo obsahuje zvýšené množství těkavých látek, lze s výhodou použít lyofilizaci (vymrazování vody za sníženého tlaku a teploty). V některých případech lze vodu odstraňovat i vysoušením nad účinnými vysoušedly, jako je např. oxid fosforečný nebo silikagel, v exsikátorech za normálního nebo sníženého tlaku.

Procentuální obsah sušiny je možné vypočítat podle Rovnice 1. [22]

$$w_s = \frac{m_{DW}}{m_{FW}} \quad (1)$$

kde:

w_s je hmotnostní zlomek sušiny ve vzorku

m_{DW} je hmotnost suchého vzorku [g]

m_{FW} je hmotnost čerstvého vzorku [g]

2.3.2 Destilační metody stanovení sušiny

Tyto metody stanovení jsou založeny na společné destilaci vody s organickým rozpouštědlem s vysokou teplotou varu a minimální mísitelností s vodou, jímání směsi v kalibrované trubici a následném měření objemu vydestilované vody. V současné době jsou používány dvě metody s řadou obměn – přímá destilace a destilace pod refluxem.

Přímé metody jsou vhodné pro stanovení vlhkosti v koření, sýrech a krmivech. Vzorek s rozpouštědlem je zahříván v lázni s médiem o vysoké teplotě varu.

V praxi se však častěji setkáváme s použitím nepřímých metod destilace pod refluxem. Při těchto metodách se nejčastěji používá destilace s organickými rozpouštědly s nižší specifickou hmotností, jako je např. toluen, xylen nebo benzen. Voda se odpařuje společně s rozpouštědlem, páry kondenzují v chladiči a stékají do kalibrované trubice. Zde dochází k separaci fází kondenzátu – voda s vyšší specifickou hmotností tvoří spodní vrstvu a přebytek rozpouštědla je vracen do předlohy. Destilace je ukončena, pokud se objem vody už nemění. Tato metoda je vhodná pro naprostou většinu potravinářských vzorků s vyšším obsahem vody. Vzorky s nízkým obsahem vody dávají méně přesné výsledky. [22]

Procentuální obsah sušiny je možné zjistit přímo ze stupnice kalibrované nádoby nebo jej vypočítat podle Rovnice 2. [23]

$$w_s = 1 - \frac{V_a}{m} \quad (2)$$

kde:

w_s je hmotnostní zlomek sušiny ve vzorku

V_a je objem vody [ml] odečtený po destilaci

m je navážka vzorku [g].

2.3.3 Optické metody stanovení sušiny

Rychlé a přesné výsledky poskytuje refraktometrické stanovení sušiny. Je založeno na proporcionalitě mezi indexem lomu a koncentrací látek rozpuštěných ve vodě. Metoda je vhodná pro sirupy, ovocné šťávy, produkty z ovoce a pro kondenzované mléko.

Infračervená spektrometrie našla široké uplatnění především v procesní analýze. Je založena na měření změn intenzity elektromagnetického záření v infračervené oblasti spektra absorbovaného nebo odraženého molekulami ve vzorku. Při stanovení vody probíhá měření intenzivních pásů v blízké nebo vzdálenější IR oblasti pro valenční vibrace OH skupin (1,94 μm nebo 2,7 μm) nebo pásů NIRS při 1400–1450 a 1920–1950 nm odpovídajících valenčním vibracím OH skupin molekuly vody. Tyto pásy je možné využít pro stanovení vody v mléce, sýrech atd. Je možné bez úpravy pracovat přímo s pevnými vzorky. [22]

2.3.4 Další možnosti stanovení

Mezi další možnosti stanovení patří denzitometrické metody, které jsou založeny na měření specifické hmotnosti ve standardizované nádobce o definovaném objemu při teplotě 20 °C vztažené na specifickou hmotnost vody. Tato metoda je vhodná pro stanovení obsahu vody v alkoholických nápojích a sušiny v mléce. Mezi denzitometrické metody se řadí také stanovení obsahu vody pomocí hustoměru, které je založeno na Archimédově zákonu. [22]

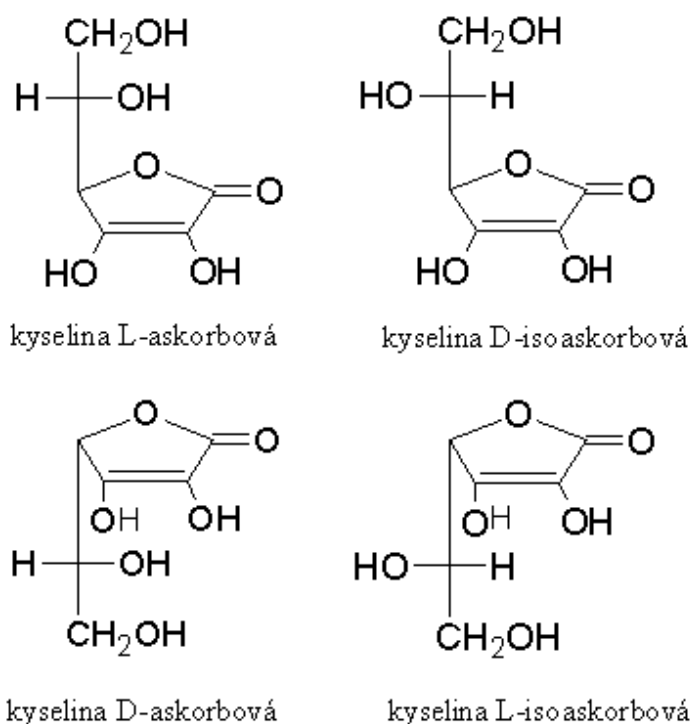
Nejen v potravinářském průmyslu se používá stanovení obsahu vody plynovou chromatografií. To se provádí na základě chemické reakce mezi karbidem vápníku a vodou, při níž vznikne acetylen, který je stanoven po oddělení na chromatografickém sloupci plamenově-ionizačním detektorem. [23]

2.4 Vitamín C

2.4.1 Chemická a strukturní charakteristika

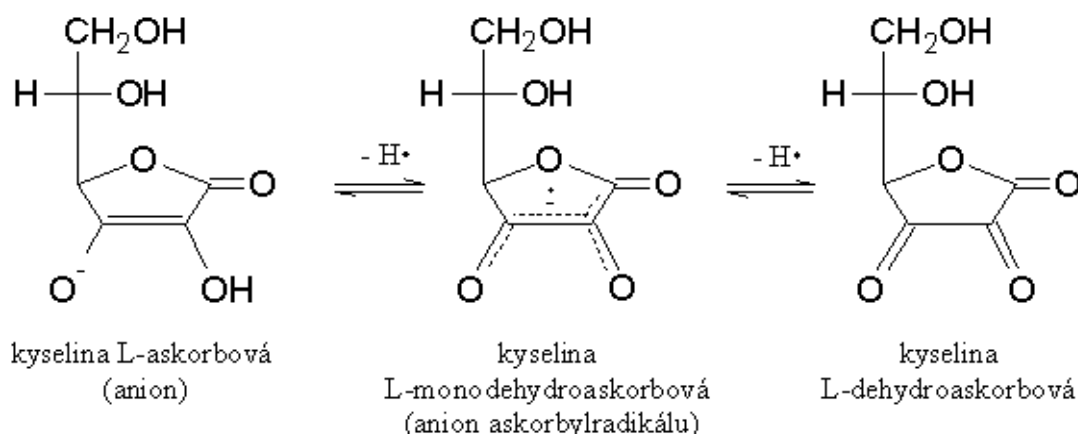
Vitamin C, nebo také kyselina askorbová, se strukturou řadí mezi deriváty sacharidů. [16] Jedná se o molekulu se sumárním vzorcem $C_6H_8O_6$ a molekulární hmotností 176,13 Da obsahující dvojnou vazbu mezi atomy C2 a C3. [24] Hydroxylová skupina na atomu C3 je rezonančně stabilizována jako keton, což molekulu činí slabě kyselou. [17]

Ze čtyř stereisomerů vykazuje aktivitu vitaminu C pouze kyselina L-askorbová (γ -lakton *L-threo*-2-hexenonové kyseliny). Její isomer, kyselina D-askorbová, a druhý pár enantiomerů, kyselina D- a L-isoaskorbová aktivitu vitaminu C prakticky nevykazují. [19]



Obrázek 4: Izomery kyseliny askorbové

Názvem vitamin C se označuje nejen kyselina L-askorbová, ale také celý reversibilní redoxní systém. [19]



Obrázek 5: Biologicky aktivní formy vitamínu C

2.4.2 Význam pro organismus člověka

Zatímco většina suchozemských živočichů je schopna endogenně vytvořit dostatečné množství vitamínu C, takže jej nepotřebují přijímat ve stravě, člověk a jiní primáti nejsou schopni vitamín C syntetizovat. Je pravděpodobné, že když se tato mutace objevila u našeho dávného předka, který se živil téměř výhradně čerstvým ovocem a zeleninou, nebyla vyřazena právě díky hojnosti vitamínu v potravě. Vyvážená strava poskytuje dostatek vitamínu C, který potřebujeme, abychom se vyhnuli problémům plynoucím z jeho deficitu. Stále se však diskutuje o potenciálních zdravotních benefitech plynoucích z konzumování suplementů obsahujících vitamín C ve velkých dávkách. [17]

Vitamin C je kofaktorem v mnoha enzymatických reakcích, včetně syntézy kolagenu. [17] Dále se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpce iontových forem železa a jeho transportu, stimuluje transport sodných, chloridových a zřejmě i vápenatých iontů. Uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcí.

Velmi důležitými reakcemi souvisejícími s antioxidačními vlastnostmi vitamínu jsou reakce s aktivními formami kyslíku, respektive s volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitamínu E, které zabezpečují ochranu vitamínu E a membrán před oxidací.

Deficit vitamínu C se projevuje řadou nespecifických problémů, nejčastěji tzv. jarní únavou. Nejznámějším syndromem akutní avitaminózy jsou kurděje, které byly závažným onemocněním u vojáků i civilistů v době obléhání nebo u námořníků z důvodu stravy chudé na zdroje vitamínu C. [19]

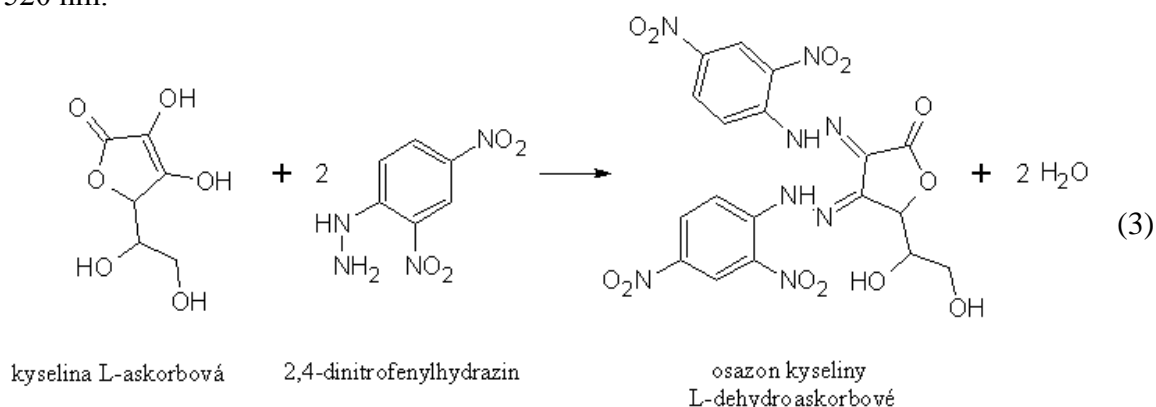
2.4.3 Manuální metody stanovení vitamínu C

Vitamín C je významná složka potravin. Kromě volné formy mohou být složky vitamínu C vázány např. v askorbigenu. Pro přesné stanovení je nejdůležitější příprava vzorku vzhledem k citlivosti na přítomnost oxidačních činidel.

2.4.3.1 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody stanovení kyseliny askorbové jsou založeny na reakci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem za tvorby nerozpustného kondenzačního produktu (osazonu) podle

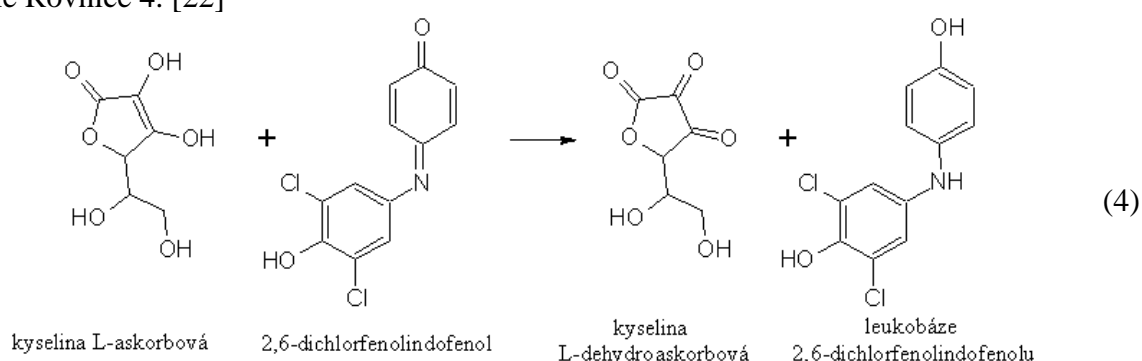
Rovnice 3. Vzniklý osazon se odfiltruje a rozpustí v chloroformu. Měří se absorpance roztoku při 520 nm.



Podobně reagují i další karbonylové sloučeniny (např. redukující cukry). Ty je proto nutné před stanovením odstranit nebo separovat. [22]

2.4.3.2 Titrační metody

Titrační metoda spočívá v reakci s redoxním indikátorem 2,6-dichlorfenolindofenolem. Vzorek je titrován v inertní atmosféře z modrého do růžového zbarvení stálého asi 15 s. Reakce probíhá podle Rovnice 4. [22]



U bezbarvých vzorků je možné provést přímou titraci. V barevných materiálech, které neobsahují interferující látky, je možné použít benzenovou modifikaci titrace, kdy se nejprve provede orientační titrace ve zkumavkách. Po protřepání a následném oddělení fází je možné pozorovat růžové zbarvení benzenové fáze u ztitrovaného vzorku. [23] Výhodnější je však u barevných vzorků použít potenciometrickou indikaci platinovou elektrodou potaženou vyredukovanou rtutí a referenční nasycenou kalomelovou elektrodou. Za přítomnosti interferujících látek obsahujících sulfhydrylové skupiny a reduktony je nutné provést blokaci těchto látek. Část interferencí lze redukovat rychlým provedením titrace, neboť interferenty reagují výrazně pomaleji. Specifitu lze zvýšit kondenzací sulfhydrylových skupin s formaldehydem při pH 0,0. Titrací stanovíme sumu redukovatelných skupin a kyseliny askorbové. Titrací při pH 3,5 stanovíme pouze sumu redukovatelných skupin. Obsah kyseliny askorbové pak vypočteme z rozdílu těchto dvou titrací. [22]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- ruční vinařský lis s plachetkou
- Erlenmeyerova baňka 300 ml (Simax, Česká republika)
- exsikátor se silikagelem
- automatická pipeta Sartorius Proline 100–1000 µl (Biohit, Finsko)
- automatická pipeta Finnpiette 0,5–5 ml (Thermo Scientific, USA)
- filtrační kelímek S4 (Simax, Česká republika)
- odsávací baňka (Simax, Česká republika)
- Büchnerova nálevka
- filtrační papír
- skleněná kyveta
- stojan na zkumavky
- zkumavky
- mikrozukumavky (Eppendorf, Německo)

3.1.2 Chemikálie

- ethanol (Penta, Česká republika)
- hydroxid sodný (Penta, Česká republika)
- kalibrační puřy pro pH metr (XS Instruments, Itálie)
- Fehlingův roztok I (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- Fehlingův roztok II (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- manganistan draselný (Penta, Česká republika)
- dihydrát kyseliny šťávelové (Penta, Česká republika)
- fenolftalein (Lachema a.s., Česká republika)
- síran železitý (Penta, Česká republika)
- kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid draselný (Lachema a.s., Česká republika)
- octan sodný (Lachema a.s., Česká republika)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- bezvodý uhličitan sodný (Lachema a.s., Česká republika)

3.1.3 Přístroje

- lednička s mrazničkou (Liebherr, Německo)
- sušárna (Mettler, Německo)
- analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
- stolní refraktometr
- pH metr (XS Instruments, Itálie)

- magnetická míchačka Color Squid (IKA-Werke, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr Helios γ (ThermoSpectronic, Velká Británie)
- elektrický vařič
- tyčový mixér

3.2 Příprava organického materiálu

Pro analýzu bioaktivních látek byly použity zmražené plody bezu černého odrůdy Allesö pocházející z Výzkumného a šlechtitelského ústavu v Holovousech. Tyto plody byly pomalu rozmrazeny a následně z nich byla pomocí ručního vinařského lisu s plachetkou vylisována šťáva. Získané výlisky byly rozloženy na alobal a vloženy do sušárny, kde byly ponechány při teplotě 42 °C po dobu 72 hodin. Takto připravené výlisky byly uchovávány v alobalu. Vylisovaná šťáva byla přelita do PET lahve a zmrazena na teplotu -18 °C.

Do analýzy byl pro lepší porovnání vzorků zařazen také bezinkový kompot od výrobce LUKOP spol.s.r.o. Ten byl rozmixován tyčovým mixérem a přefiltrován pomocí Büchnerovy nálevky. Filtrát byl přelit do PET lahve a zmražen na teplotu -18 °C.

3.3 Příprava extraktů z bezinkových výlisků

Do Erlenmeyerovy baňky bylo na analytických vahách naváženo 25 g suchých výlisků. Ty byly zality 100 ml rozpouštědla. Hrdlo baňky bylo překryto alobalem a baňka byla ponechána v temnu.

Za účelem zjištění optimálních podmínek extrakce byly výlisky extrahovány dvěma různými rozpouštědly – destilovanou vodou a směsí destilované vody a ethanolu v poměru 1:1. Byla volena taková rozpouštědla, která jsou použitelná v potravinářské výrobě. Jako parametr kvality extraktu byl zvolen obsah anthokyanů. Extrakce probíhala tak dlouho, dokud rostl obsah anthokyanů v odebíraných vzorcích.

V průběhu extrakce byl odebírán každou hodinu 1 ml extraktu po dobu 14 hodin. Odebraný vzorek byl vždy přelit do mikrozkušavky a zmražen na teplotu -18 °C. Následně byl do Erlenmeyerovy baňky doplněn 1 ml rozpouštědla, aby nedocházelo k úbytku objemu. Odebrané vzorky byly později použity ke stanovení obsahu anthokyanů.

Na základě výsledků první série extrakcí byla provedena další extrakce s rozpouštěcí směsí vody a ethanolu v poměru 1:1. Při této extrakci bylo odebráno 15 ml extraktu v čase 13, 14 a 15 hodin. Vzorky byly přelity do plastových vzorkovacích nádobek a zmrazeny na teplotu -18 °C. Odebrané vzorky sloužily ke stanovení vybraných chemických a fyzikálních vlastností extraktů.

3.4 Stanovení sušiny sušením při 105 °C

Na analytických vahách bylo zváženo přibližně dvacet plodů bezu. Plody byly položeny do předem zvážené Petriho misky. Takto byly pro stanovení připraveny tři Petriho misky. Všechny byly vloženy do sušárny, kde byly ponechány 12 hodin při teplotě 105 °C. Následně byly přeneseny do exsikátoru, kde byly ponechány 1 hodinu. Po vychladnutí byly misky zváženy na analytických vahách a opět přeneseny do sušárny, kde byly ponechány další 2 hodiny. Poté byly přeneseny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy. Tento krok byl ještě jednou zopakován.

Výpočet obsahu sušiny byl proveden podle Rovnice 1 (viz kapitola 2.3.1).

3.5 Stanovení refraktometrické sušiny

Na očištěný spodní hranol stolního refraktometru, u kterého byla předem zkontrolována nulová hodnota, bylo Pasteurovou pipetou nanášeno malé množství koncentrovaného vzorku a rozetřeno po celé ploše hranolu. Po přiklopení horního hranolu a zajištění hranolů klíčem bylo pomocí bočního šroubu nastaveno rozhraní světla a stínu přesně do polohy průsečíku kříže. Na boční stupnici refraktometru byl odečten index lomu vzorku. Refraktometrická sušina byla určena pomocí tabulek závislosti koncentrace sacharózy na indexu lomu.

3.6 Stanovení redukujících cukrů

3.6.1 Příprava vzorků

Vzorky extraktů, šťávy i kompotu byly rozmrazeny a důkladně promíchány. Poté byly ředěny destilovanou vodou v odměrných baňkách na 100 ml v poměru 1:49 v případě vzorků extraktů a v poměru 1:99 v případě vzorků šťávy a kompotu. Pipetované množství vzorku bylo zváženo na analytických vahách.

3.6.2 Gravimetrická metoda

3.6.2.1 Postup stanovení

Do Erlenmeyerovy baňky bylo napipetováno 20 ml Fehlingova roztoku I a II a roztok byl zahříván na elektrickém vařiči. Po dosažení teploty 60 °C bylo do roztoku přidáno 20 ml zředěného vzorku. Poté byl roztok přiveden k mírnému varu, který byl udržován dvě minuty. Následně byl roztok zchlazen na laboratorní teplotu proudem studené vody. Chladný roztok byl filtrován za sníženého tlaku na předem zváženém filtračním kelímku S4. Odfiltrovaná sraženina byla třikrát promyta ethanolem. Kelímek byl vložen do vyhřáté sušárny, kde byl ponechán 45 minut při teplotě 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru byl kelímek se sraženinou zvážen na analytických vahách.

3.6.2.2 Výpočet

Celkový obsah redukujících cukrů ve zředěných vzorcích byl vypočten podle Rovnice 5:

$$c = m \cdot f_p \cdot F \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1} \quad (5)$$

kde:

c je koncentrace redukujících cukrů ($\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$)

m je hmotnost sraženiny Cu_2O (mg)

f_p je přepočítávací faktor pro gravimetrickou metodu stanovení redukujících cukrů (0,462)

F je faktor pro přepočet na 100 ml zředěného roztoku (5)

Vypočtená koncentrace byla přepočtena na obsah redukujících cukrů v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ suchých výlisků pro vzorky extraktů a v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ tekutiny pro vzorky šťávy a kompotu.

3.6.3 Metoda podle Berthrandu

3.6.3.1 Standardizace odměrného roztoku manganistanu draselného

Na analytických vahách bylo naváženo 0,63 g dihydrátu kyseliny šťavelové. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml a rozpuštěna v 50 ml destilované vody. Baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Do titrační baňky bylo napipetováno 10 ml připraveného standardního roztoku kyseliny šťavelové a 5 ml roztoku kyseliny sírové o koncentraci $4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z byrety byl do baňky přidán 1 ml odměrného roztoku manganistanu draselného. Roztok byl zahříván na elektrickém vařiči na 60°C a po odbarvení byl titrován odměrným roztokem manganistanu draselného do slabě růžového zbarvení. Titrace byla provedena třikrát.

3.6.3.2 Postup stanovení

Do Erlenmeyerovy baňky bylo napipetováno 20 ml Fehlingova roztoku I a II. Roztok byl zahříván na elektrickém vařiči a po dosažení teploty 60°C do něj bylo přidáno 10 ml zředěného vzorku. Roztok byl přiveden k mírnému varu, který byl udržován dvě minuty. Poté byl roztok zchlazen proudem studené vody na laboratorní teplotu. Roztok byl filtrován za sníženého tlaku na filtračním kelímku S4. Odfiltrovaná sraženina byla důkladně promyta vodou. Poté byla vyměněna odsávací láhev za čistou a do filtračního kelímku byl po malých dávkách přidáván síran železitý do úplného rozpuštění sraženiny. Roztok v odsávací baňce byl ihned titrován odměrným roztokem manganistanu draselného do slabě růžového zbarvení.

3.6.3.3 Výpočet

Celkový obsah redukujících cukrů ve zředěných vzorcích byl vypočten podle Rovnice 6:

$$c = V \cdot f_p \cdot F \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1} \quad (6)$$

kde:

V je objem roztoku manganistanu draselného spotřebovaného na titraci vzorku (ml)

f_p je přepočítávací faktor ($f_p = 3,315$ pro manganistan draselný o koncentraci $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

F je faktor pro přepočet na 100 ml zředěného roztoku (10)

Vypočtená koncentrace redukujících cukrů byla přepočtena na obsah redukujících cukrů v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ suchých výlisků pro vzorky extraktů a v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ tekutiny pro vzorky šťávy a kompotu.

3.7 Stanovení pH a obsahu titrovatelných kyselin

3.7.1 Příprava odměrného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Na analytických vahách bylo naváženo 10 g hydroxidu sodného. Navážka byla postupně rozpuštěna v 500 ml destilované vody. Roztok byl převeden do odměrné baňky na 1000 ml, která byla následně doplněna destilovanou vodou po rysku.

3.7.2 Standardizace odměrného roztoku hydroxidu draselného

Na analytických vahách bylo naváženo 1,26 g dihydrátu kyseliny šťavelové. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml a rozpuštěna v 50 ml destilované vody. Baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Do titrační baňky bylo napipetováno 10 ml připraveného standardního roztoku kyseliny šťavelové a kapátkem byly přidány tři kapky roztoku fenolftaleinu. Takto připravený roztok byl titrován odměrným roztokem hydroxidu sodného do světle růžového zbarvení. Titrace byla provedena třikrát.

3.7.3 Příprava vzorků a postup stanovení

Vzorky extraktů, šťávy a kompotu byly pomalu rozmrazeny a důkladně promíchány. Vzorky šťávy a kompotu byly ponechány bez další úpravy. Vzorky extraktů byly z důvodu malého objemu pro stanovení naředěny destilovanou vodou v odměrné baňce na 100 ml v poměru 1:9.

Do kádinky na 100 ml bylo napipetováno 25 ml. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byl ponořen pH metr. Byla zaznamenána počáteční hodnota pH. Poté byl roztok za stálého míchání titrován odměrným roztokem hydroxidu sodného do hodnoty pH 7,0. Titrace byla pro každý vzorek provedena třikrát.

3.7.4 Výpočet

Celkový obsah titrovatelných kyselin byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny citronové. Pro výpočet byla použita soustava rovnic (Rovnice 7 a Rovnice 8):

$$c_{H^+} = \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot F}{V_{vz}} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \quad (7)$$

$$c = \frac{c_{H^+} \cdot M}{3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \quad (8)$$

kde:

c_{H^+} je koncentrace kyselých vodíkových iontů ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

c_{NaOH} je koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

V_{NaOH} je objem odměrného roztoku spotřebovaný při titraci (ml)

c je výsledná koncentrace kyseliny citronové ve vzorku ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

M je molární hmotnost kyseliny citronové ($192,13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Vypočtená celková koncentrace titrovatelných kyselin byla přepočtena na obsah kyselin v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ suchých výlisků pro vzorky extraktů a v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ tekutiny pro vzorky šťávy a kompotu.

3.8 Stanovení celkových anthokyanových látek pH-diferenciální metodou

3.8.1 Příprava pufru chloridu draselného o koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pH 1,0

Na analytických vahách bylo naváženo 1,86 g chloridu draselného a navážka byla kvantitativně převedena do kádinky na 1000 ml. Do kádinky bylo přidáno 980 ml vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byl ponořen pH metr. Do roztoku byla pomalu

přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková do hodnoty pH 1,0. Následně byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml. Ta byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

3.8.2 Příprava pufru octanu sodného o koncentraci $0,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pH 4,5

Na analytických vahách bylo naváženo 54,43 g octanu sodného a navážka byla kvantitativně převedena do kádinky na 1000 ml. Do kádinky bylo přidáno 980 ml vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byl ponořen pH metr. Do roztoku byla pomalu přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková do hodnoty pH 4,5. Následně byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml. Ta byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

3.8.3 Příprava vzorků a postup stanovení

Vzorky extraktů byly rozmrazeny a důkladně promíchány. Následně byly naředěny destilovanou vodou v odměrných baňkách na 10 ml v poměru 9:91, 1:19 nebo 1:39 v závislosti na intenzitě zbarvení extraktu.

Vzorky šťávy a kompotu byly rozmrazeny a důkladně promíchány. Poté byly zředěny destilovanou vodou v odměrných baňkách na 100 ml v poměru 1:99.

Do šesti zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml zředěného vzorku. Do tří z těchto zkumavek bylo napipetováno 2,5 ml pufru octanu sodného a do dalších tří zkumavek bylo napipetováno 2,5 ml pufru chloridu draselného. Obsah zkumavek byl promíchán. Pomocí spektrofotometru byla měřena absorbance každého připraveného vzorku při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

3.8.4 Výpočet

Celkový obsah anthokyanů byl vyjádřen jako ekvivalent cyanidin 3-glukosidu (CGE). Pro výpočet byla použita Rovnice 9:

$$c = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \quad (9)$$

kde:

c je výsledná koncentrace anthokyanů ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

M je molekulová hmotnost cyanidin 3-glukosidu ($449,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

F je faktor ředění

ε je molární absorpční koeficient cyanidin 3-glukosidu ($26\,900 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l je délka dráhy průchodu světla vzorkem, tedy délka kyvety (cm)

Vypočtená koncentrace anthokyanů byla přepočtena na obsah anthokyanů v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ suchých výlisků pro vzorky extraktů a v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ tekutiny pro vzorky šťávy a kompotu.

3.9 Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua

3.9.1 Příprava 7,5% roztoku uhličitanu sodného

Na analytických vahách bylo naváženo 7,5 g uhličitanu sodného. Navážka byla rozpuštěna v 90 ml destilované vody a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml. Baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

3.9.2 Příprava vzorků a postup stanovení

Vzorky extraktů byly rozmrazeny a důkladně promíchány. Následně byly naředěny destilovanou vodou v odměrných baňkách na 10 ml v poměru 1:39.

Vzorky šťávy a kompotu byly rozmrazeny a důkladně promíchány. Poté byly zředěny destilovanou vodou v odměrných baňkách na 100 ml v poměru 1:99.

Do tří zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml zředěného vzorku. Roztoky byly promíchány a ponechány 5 minut stát. Poté byl do každé zkumavky přidán 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl opět promíchán. Takto připravené vzorky byly ponechány 2 hodiny stát. Poté byla pomocí spektrofotometru měřena absorbance vzorků při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek byl připraven podle stejného postupu, avšak místo zředěného vzorku extraktu bylo do roztoku přidáno 0,1 ml destilované vody.

3.9.3 Výpočet

Celkový obsah fenolických látek ve vzorcích byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro výpočet byla použita již dříve sestavená kalibrační křivka, která má rovnici regrese (Rovnice 10):

$$A = 0,0036 \cdot c + 0,0086 \quad (10)$$

kde:

A je hodnota absorbance

c je celková koncentrace fenolických látek ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

Vypočtená koncentrace fenolických látek byla přepočtena na obsah fenolických látek v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ suchých výlisků pro vzorky extraktů a v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ tekutiny pro vzorky šťávy a kompotu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této bakalářské práci byly stanoveny vybrané chemické a fyzikální charakteristiky šťávy z černého bezu a extraktů z jeho výlisků. Stanovené hodnoty byly vzájemně porovnány a diskutovány.

Šťáva z černého bezu, extrakty z výlisků a vzorek kompotu byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.

4.1 Stanovení sušiny

Obsah sušiny v celých plodech bezu černého byl stanoven sušením do konstantní hmotnosti při 105 °C. Průměrná hodnota ze tří stanovení činila 18,7 hmotnostních %. Tato hodnota je o 1,5 % nižší než hodnota udávaná literaturou (viz kapitola 2.2.5). To může být způsobeno mnoha faktory, např. odlišnými podmínkami při pěstování a sklizení plodů nebo nedokonalým odstraněním ledových krystalků před rozmrazením plodů.

4.2 Výběr nejvýhodnější extrakce

Za účelem výběru nejvýhodnějších extrakčních podmínek byly provedeny dvě extrakce bioaktivních látek z výlisků bezu černého s různými rozpouštědly – destilovanou vodou a směsí destilované vody a ethanolu v poměru 1:1. Jako parametr kvality extraktu byl zvolen obsah celkových anthokyanů, který byl stanoven pomocí pH-diferenciální metody a přepočten na ekvivalent cyanidin 3-glukosidu vyextrahovaného ze 100 g suchých výlisků. Vzorky byly odebírány v intervalu jedné hodiny po dobu 14 hodin.

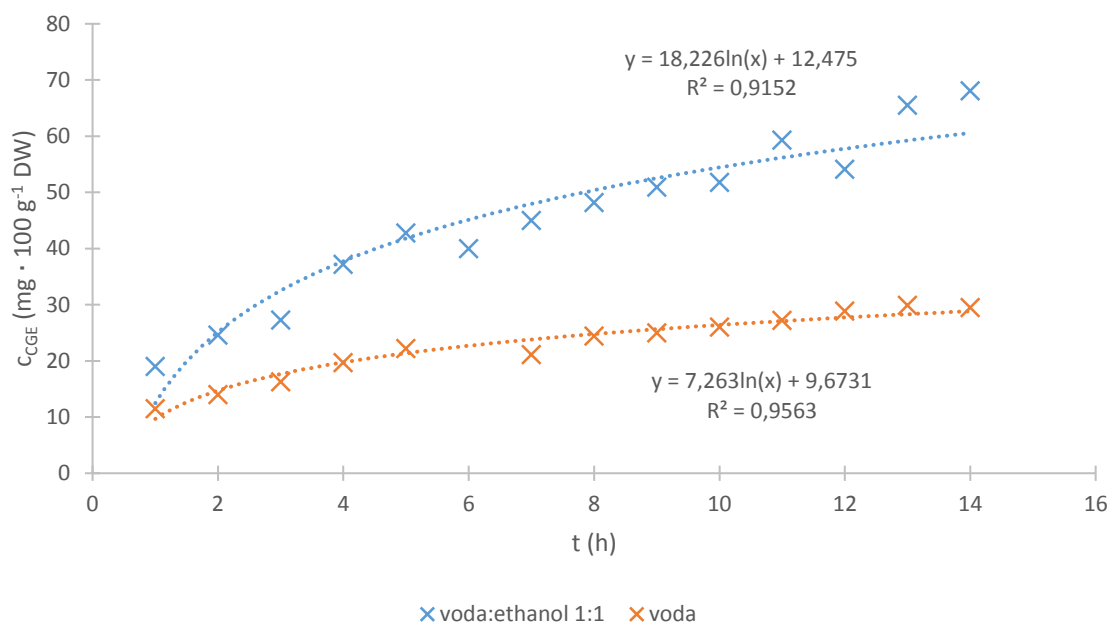
Výsledky měření anthokyanových látek v extraktech jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Koncentrace celkových anthokyanových látek v extraktech

doba extrakce (h)	c (mg · 100 g ⁻¹ DW)	
	voda	voda:ethanol 1:1
1	11,5	19,0
2	14,0	24,6
3	16,3	27,3
4	19,7	37,2
5	22,2	42,8
6	16,4*	40,0
7	21,1	45,0
8	24,4	48,2
9	25,0	50,9
10	26,0	51,8
11	27,2	59,3
12	28,9	54,1
13	29,9	65,5
14	29,5	68,1

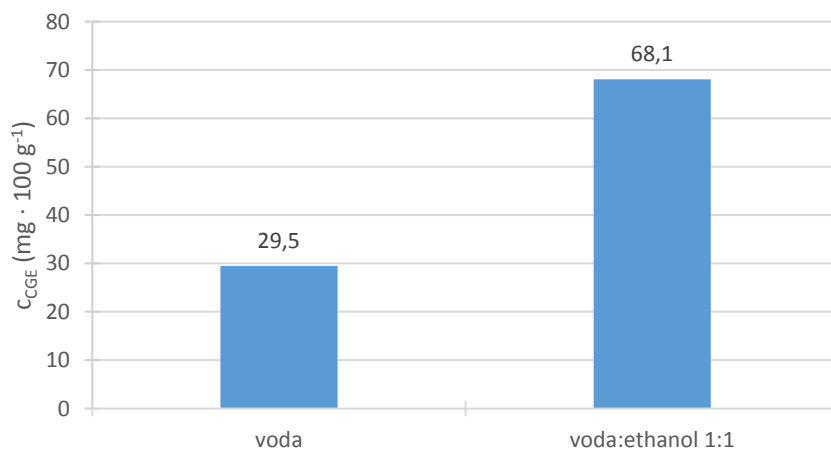
* hodnota je výrazně odlehlá, byla tedy vyřazena

Z naměřených výsledků je patrné, že s přibývajícím dobou extrakce se obsah anthokyanových látek zvyšuje. Tento nárůst je výraznější v první polovině doby extrakce. V druhé polovině růst koncentrace není tak výrazný a ke konci extrakce je již nepatrný. Závislost koncentrace anthokyanů na čase pro obě extrakce je znázorněna v Grafu 1. V tomto grafu je také viditelný výrazný rozdíl v účinnosti rozpouštědel. Hodnoty koncentrací anthokyanových látek v extrakční směsi s ethanolem jsou přibližně dvakrát větší než hodnoty v extrakční směsi s čistou vodou.



Graf 1: Časová závislost extrakce anthokyanů různými rozpouštědly

Nejllepší výsledek extrakce byl dosažen v čase 14 hodin s použitím extrakční směsi vody a ethanolu. V tomto vzorku byla koncentrace anthokyanů stanovena na $68,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ suchých výlisků. To je více než dvakrát větší množství anthokyanů, než bylo stanoveno ve vzorku extraktu využívajícím jako rozpouštědlo čistou vodu a odebraném ve stejném čase. Porovnání vzorků extraktů odebraných ve 14 hodinách extrakce graficky znázorňuje Graf 2.



Graf 2: Porovnání koncentrace anthokyanů ve vzorcích extraktů odebraných v čase 14 hodin

Na základě těchto výsledků byla jako účinnější vyhodnocena extrakce ve směsi vody a ethanolu. Vzhledem k tomu byla pro další extrakci použita jen tato směs.

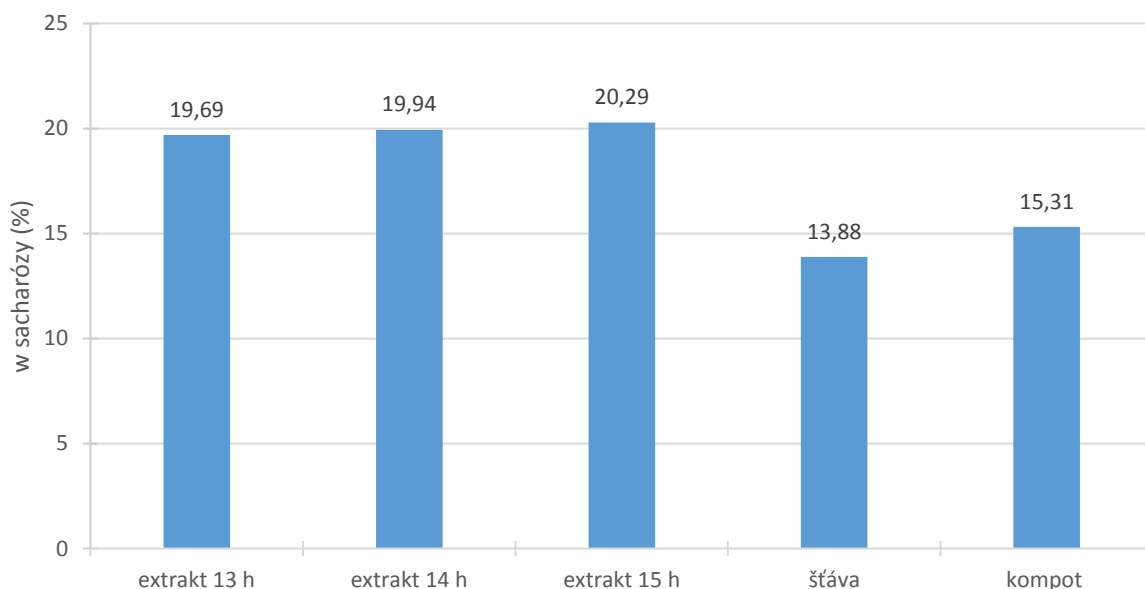
4.3 Stanovení refraktometrické sušiny

Obsah refraktometrické sušiny byl stanoven ve vzorcích extraktu s rozpouštěcí směsí vody a ethanolu odebraných v čase 13, 14 a 15 hodin a u vzorků bezové šťávy a kompotu. Stanovení bylo provedeno pomocí stolního refraktometru. Obsah refraktometrické sušiny byl vyjádřen v procentech jako ekvivalent sacharózy. Přepočet z naměřeného indexu lomu byl proveden podle tabulek v literatuře [21].

Z výsledných hodnot refraktometrické sušiny uvedených v Tabulce 8 vyplývá, že v extraktech z výlisků je větší obsah rozpuštěných látek než v bezové šťávě a v kompotu. Hodnoty refraktometrické sušiny v jednotlivých extraktech se od sebe lišily velmi málo. Grafické porovnání obsahu rozpuštěných látek ve vzorcích uvádí Graf 3.

Tabulka 8: Obsah refraktometrické sušiny

vzorek	sacharóza (%)
extrakt 13 h	19,69
extrakt 14 h	19,94
extrakt 15 h	20,29
šťáva	13,88
kompot	15,31



Graf 3: Porovnání obsahu rozpuštěných látek ve vzorcích

4.4 Stanovení redukujících cukrů

Koncentrace redukujících cukrů byla stanovena ve vzorcích extraktu s rozpouštěcí směsí vody a ethanolu odebraných v čase 13, 14 a 15 hodin a u vzorků bezové šťávy a kompotu. Stanovení bylo provedeno dvěma metodami – gravimetricky a podle Berthrandu. Obsah redukujících

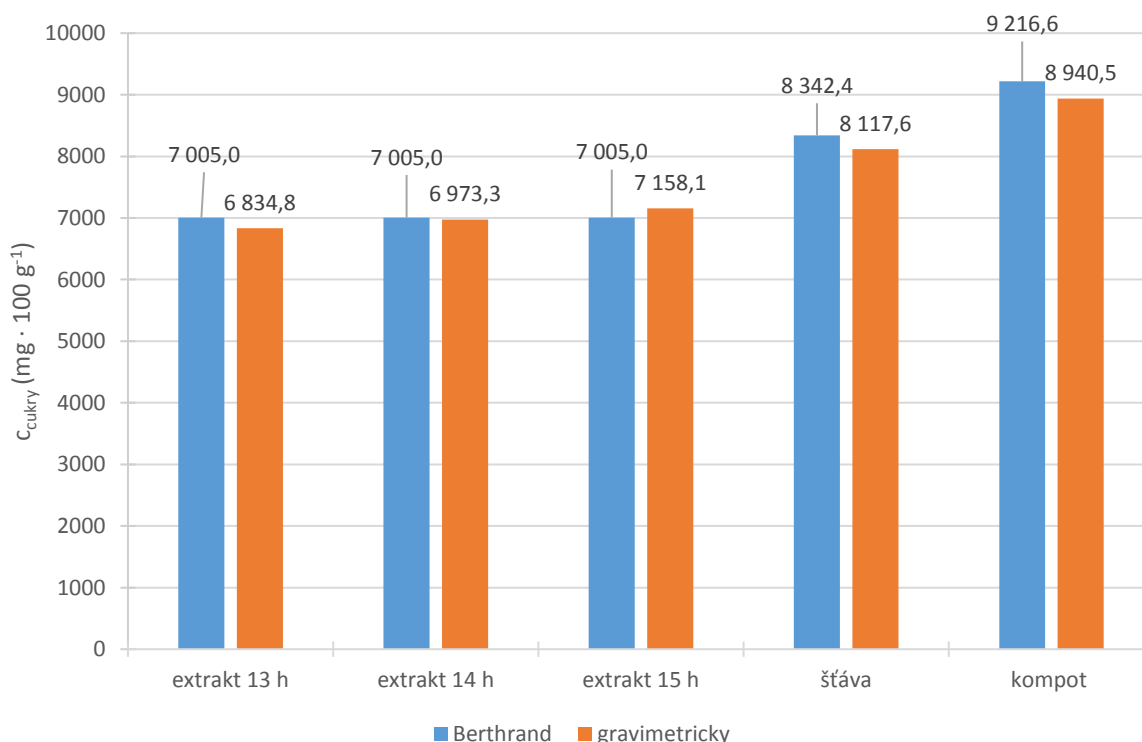
cukrů byl pro vzorky extraktů přepočten na množství redukujících cukrů vyextrahovaného ze 100 g suchých výlisků.

Výsledky stanovení koncentrace redukujících cukrů jsou uvedeny v Tabulce 9. Obsah redukujících cukrů je v extraktech z výlisků o něco menší než v bezové šťávě a kompotu. Jednotlivé extrakty se obsahem redukujících cukrů příliš neliší. Grafické porovnání koncentrace redukujících cukrů ve vzorcích a výsledků obou metod udává Graf 4.

Použité metody poskytují mírně odlišné výsledky. Podle gravimetrické metody je obsah redukujících cukrů v každém stanovení o něco menší než podle metody Berthrand. Dá se předpokládat, že přesnější stanovení poskytuje gravimetrická metoda, jelikož se skládá z méně kroků a je tedy zatížena menší chybou.

Tabulka 9: Výsledné koncentrace redukujících cukrů

vzorek	c (mg · 100 g ⁻¹)	
	gravimetricky	Berthrand
extrakt 13 h	6 834,8	7 005,0
extrakt 14 h	6 973,3	7 005,0
extrakt 15 h	7 158,1	7 005,0
šťáva	8 117,6	8 342,4
kompot	8 940,5	9 216,6



Graf 4: Porovnání obsahu redukujících cukrů a srovnání metod stanovení

4.5 Stanovení pH a obsahu titrovatelných kyselin

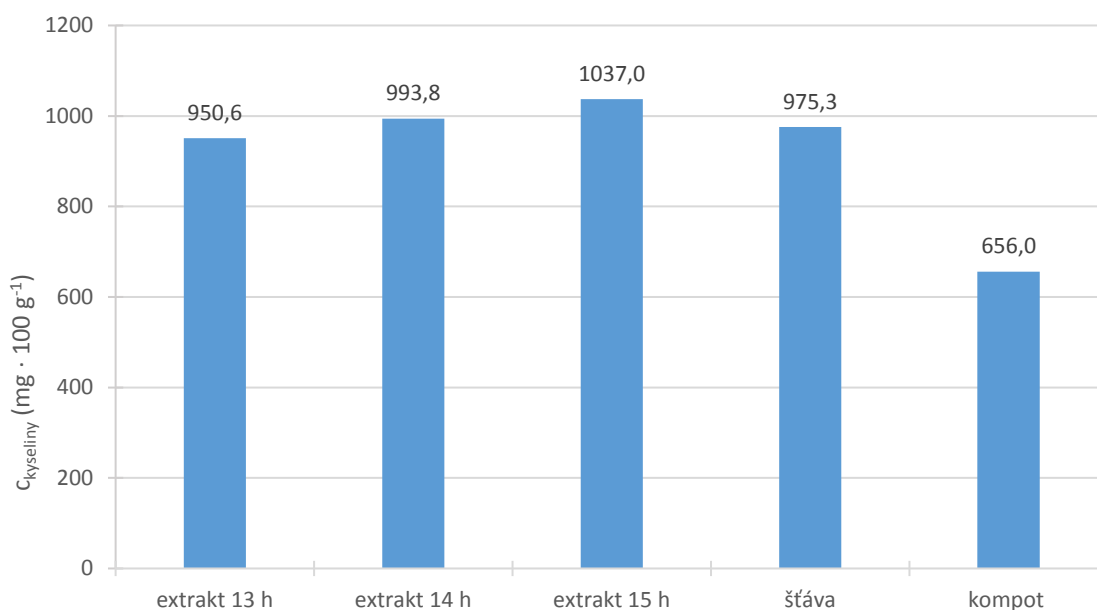
Stanovení pH a obsahu titrovatelných kyselin bylo provedeno ve vzorcích extraktu s extrakční směsí vody a ethanolu odebraných v čase 13, 14 a 15 hodin a u vzorků bezové šťávy a kompotu.

Výsledky obsahu titrovatelných kyselin byly stanoveny titrací odměrným roztokem hydroxidu sodného do hodnoty pH 7,0 pomocí pH metru a byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny citronové. Pro vzorky extraktů byl proveden přepočet na množství titrovatelných kyselin vyextrahovaných ze 100 g suchých výlisků.

Naměřené hodnoty pH a koncentrace kyselin jsou uvedeny v Tabulce 10. Nejmenší obsah kyselin byl zjištěn ve vzorku kompotu, avšak v tomto vzorku současně bylo naměřeno nejnižší pH. Ve vzorcích extraktů je pH stejné, ale obsah kyselin mírně stoupá s přibývajícím dobou extrakce. V extraktech bylo naměřeno podobné pH i obsah kyselin jako v bezové šťávě. Grafické porovnání výsledků stanovení celkových titrovatelných kyselin udává Graf 5.

Tabulka 10: Výsledné koncentrace celkových titrovatelných kyselin a hodnoty pH

vzorek	pH	c (mg · 100 g ⁻¹)
extrakt 13 h	4,05	950,6
extrakt 14 h	4,04	993,8
extrakt 15 h	4,04	1 037,0
šťáva	4,16	975,3
kompot	3,74	656,0



Graf 5: Porovnání obsahu titrovatelných kyselin

4.6 Stanovení celkových anthokyanových barviv

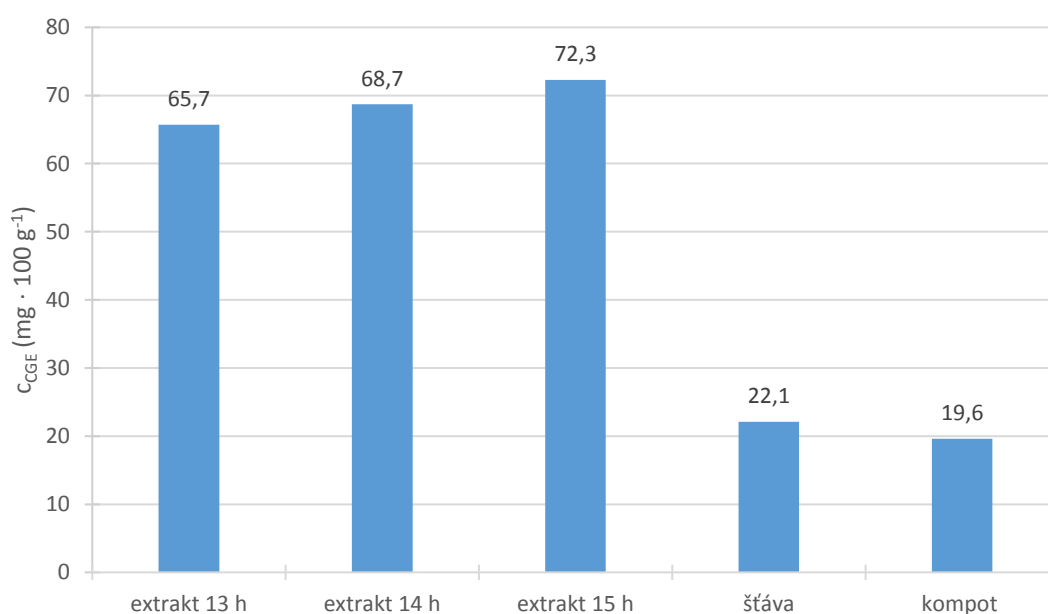
Obsah celkových anthokyanových látek byl stanoven ve vzorcích extraktu s rozpouštěcí směsí vody a ethanolu odebraných v čase 13, 14 a 15 hodin a u vzorků bezové šťávy a kompotu. Stanovení bylo provedeno pH-diferenciální metodou a výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalent cyanidin 3-glukosidu. Obsah celkových anthokyanových látek byl pro vzorky extraktů přepočten na množství vyextrahovaných anthokyanů ze 100 g suchých výlisků.

Výsledky stanovení anthokyanových látek jsou uvedeny v Tabulce 11. Hodnoty stanovené u extraktů se liší minimálně, avšak je patrný nárůst koncentrace anthokyanů s přibývajícím dobou

extrakce. Koncentrace anthokyanů ve vzorcích šťávy a kompotu je přibližně třikrát menší než koncentrace stanovené v extraktech, což je způsobeno tím, že převážná část anthokyanových látek v ovoci se nachází ve slupkách. Grafické porovnání výsledků udává Graf 6.

Tabulka 11: Výsledné koncentrace celkových anthokyanových látek

vzorek	c (mg · 100 g ⁻¹)
extrakt 13 h	65,7
extrakt 14 h	68,7
extrakt 15 h	72,3
šťáva	22,1
kompot	19,6



Graf 6: Porovnání obsahu anthokyanových barviv

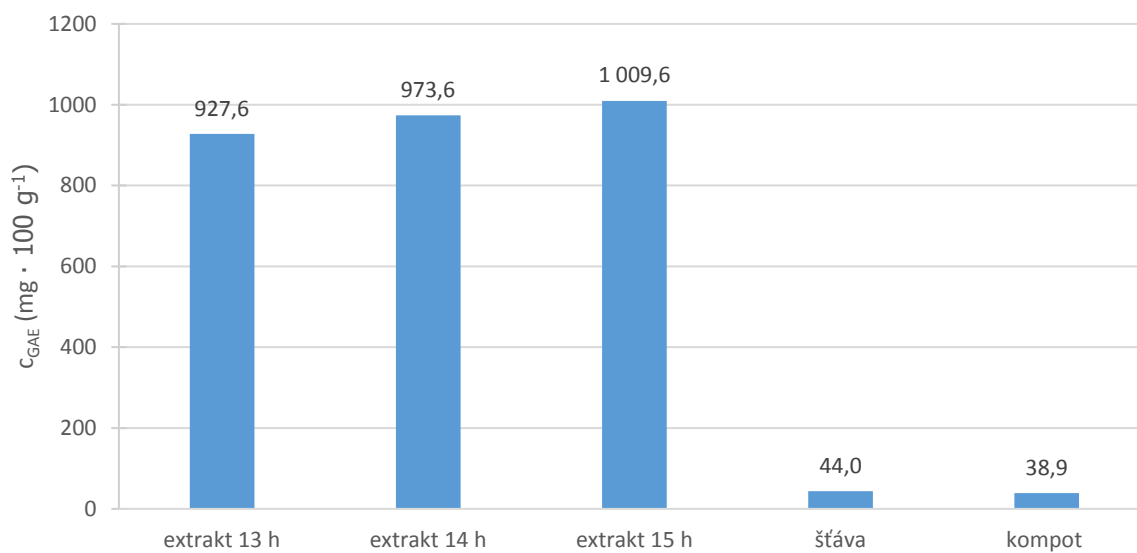
4.7 Stanovení celkových fenolických látek

Obsah celkových fenolických látek byl stanoven ve vzorcích extraktu s rozpouštěcí směsí vody a ethanolu odebraných v čase 13, 14 a 15 hodin a u vzorků bezové šťávy a kompotu. Stanovení bylo provedeno metodou podle Folin-Ciocalteu. Výsledná koncentrace fenolických látek byla vyjádřena jako ekvivalent kyseliny gallové. Koncentrace celkových fenolických látek byla pro vzorky extraktů přepočtena na množství vyextrahovaných fenolických látek ze 100 g suchých výlisků.

Výsledné hodnoty koncentrace fenolických látek jsou uvedeny v Tabulce 12. Hodnoty stanovené ve vzorcích extraktů mírně stoupají s přibývajícím dobou extrakce, avšak výrazně se od sebe neliší. Koncentrace fenolických látek zjištěná ve vzorku šťávy a kompotu je mnohonásobně nižší než koncentrace stanovené v extraktech, což je způsobeno tím, že převážná část fenolických látek, které ovoce obsahuje, je obsažena ve slupkách.

Tabulka 12: Výsledné koncentrace celkových fenolických látek

vzorek	c (mg · 100 g ⁻¹)
extrakt 13 h	927,6
extrakt 14 h	973,6
extrakt 15 h	1 009,6
šťáva	44,0
kompot	38,9



Graf 7: Porovnání obsahu celkových fenolických látek

5 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla zpracována literární rešerše pojednávající o bezu černém a jeho botanické charakteristice, rozšíření a o možnostech využití jednotlivých částí rostliny v potravinářství a léčitelství. Významná část této kapitoly je věnována bioaktivním látkám, které plody bezu černého obsahují. Dále je v teoretické části popsána sušina a metody jejího stanovení. Poslední kapitola teoretické části pojednává o vitamínu C, jeho významu pro lidský organismus a o manuálních metodách stanovení této látky.

Cílem praktické části bylo stanovit vybrané chemické charakteristiky ve šťávě a kompotu z bezu černého (*Sambucus nigra* L.) odrůdy Allesö a ve vybraných extraktech z bezinkových výlisků. Extrakty, pro které byla stanovení chemických charakteristik provedena, byly vybrány na základě průzkumu nejvýhodnějších extrakčních podmínek. Na základě výsledků časového průběhu extrakcí a porovnání účinnosti dvou rozpouštědel, destilované vody a směsi destilované vody a ethanolu v poměru 1:1, byly vybrané chemické charakteristiky stanoveny pro vzorky odebrané v čase 13, 14 a 15 hodin při extrakci směsí vody a ethanolu. Mezi vybrané chemické charakteristiky byl zařazen obsah refraktometrické sušiny, obsah redukujících cukrů, hodnota pH, obsah celkových titrovatelných kyselin a obsah celkových anthokyanových a fenolických látek. Dále bylo provedeno stanovení obsahu sušiny v celých plodech bezu černého.

Procentuální podíl sušiny v plodech byl stanoven sušením do konstantní hmotnosti při 105 °C na 18,7 %. Tato hodnota je menší než hodnota udávaná literaturou (viz kapitola 2.2.5), avšak ne výrazně. Rozdíl mezi hodnotami je pravděpodobně způsoben jinými podmínkami při pěstování a sklizení plodů nebo rozdílnou odrůdou bezu černého.

Obsah refraktometrické sušiny byl stanoven pomocí stolního refraktometru. Nejvyšší hodnota, 20,29 % rozpuštěných látek, byla naměřena ve vzorku extraktu odebraného po 15 hodinách extrakce. Hodnoty naměřené ve všech vzorcích jsou si však relativně blízké.

Pro stanovení redukujících cukrů byly použity dvě metody – gravimetrická metoda a metoda podle Berthrand. Metody poskytovaly mírně odlišné výsledky. Jako přesnější byla z důvodu menšího zatížení chybou vyhodnocena metoda gravimetrická. Nejvyšší obsah redukujících cukrů byl podle očekávání naměřen ve vzorku kompotu, protože kompot byl při výrobě doslazován. Avšak naměřená hodnota $8\,940,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ je srovnatelná s hodnotami stanovenými v ostatních vzorcích.

Stanovení pH a obsahu titrovatelných kyselin bylo provedeno pomocí pH metru titrací odměrným roztokem hydroxidu sodného do hodnoty pH 7,0. Nejvyšší obsah titrovatelných kyselin, $1\,037,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, byl stanoven ve vzorku extraktu odebraném po 15 hodinách extrakce. Obsah kyselin ve šťávě a ve vzorcích extraktů je podobný, jen obsah kyselin v kompotu je přibližně o třetinu menší než v ostatních vzorcích.

Nejvyšší obsah celkových anthokyanových barviv, $72,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, byl pomocí pH-diferenciální metody nalezen ve vzorku extraktu odebraném po 15 hodinách extrakce. Mezi hodnotami stanovenými v jednotlivých vzorcích extraktů je patrný nárůst obsahu anthokyanů s přibývajícím dobou extrakce. Hodnoty stanovené ve vzorcích bezinkové šťávy a kompotu jsou přibližně třikrát menší než hodnoty naměřené v extraktech, což potvrzuje domněnku, že převážná část anthokyanových látek je obsažena ve slupkách ovoce.

Obsah celkových fenolických látek byl stanoven podle metody Folin-Ciocalteua. Nejvyšší hodnota obsahu fenolických látek $1\,009,6\text{ mg} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ byla stanovena ve vzorku extraktu odebraném v 15 hodinách extrakce. U hodnot stanovených pro vzorky extraktů je patrný nárůst koncentrace fenolických látek s přibývajícím dobou extrakce. Stanovený obsah fenolických látek je v extraktech mnohonásobně vyšší než ve vzorcích šťávy a kompotu. Tato skutečnost potvrzuje domněnku, že většina fenolických látek v ovoci je obsažena ve slupkách.

Z výsledků je patrné, že extrakty z výlisků plodů bezu černého jsou nejen výborným zdrojem anthokyanových barviv a fenolických látek, ale také jsou v ostatních vybraných chemických charakteristikách srovnatelné s bezinkovou šťávou.

Pro lepší vyhodnocení provedených experimentů by bylo vhodné použít rozdílné odrůdy bezu černého. To by poskytlo širší spektrum výsledků, které by bylo možné lépe porovnat s literaturou.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠTURSA, Jan. *Dřeviny: opadavé i stálezelené v ilustracích Věry Ničové*. Vydání první. Praha: Aventinum, 2016. Artia (Aventinum). ISBN 978-80-7442-082-5.
- [2] HEMGESBERG, Hanspeter. *Černý bez a naše zdraví: květy, listy a plody černého bezu léčí všechny potíže*. 1. vyd. Olomouc: Fontána, 2002. ISBN 80-861-7998-2.
- [3] *Sambucus nigra* L. black elderberry. In: *United States Department of Agriculture* [online]. Washington, DC, b.r. [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SANI4>
- [4] ZIČHA, Ondřej. Bez černý *Sambucus nigra* L. In: *BioLib.cz* [online]. c 1999-2017 [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id40476/>
- [5] ÚRADNÍČEK, Luboš. *Dřeviny České republiky*. 2., přeprac. vyd. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, 2009. ISBN 978-80-87154-62-5.
- [6] GRAU, Jürke, Reinhard JUNG a Bertram MÜNKER. *Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny*. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 1996. Průvodce přírodou (Knižní klub). ISBN 80-717-6369-1.
- [7] JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin*. 1. vyd. Praha: Eminent, 1994. ISBN 80-858-7602-7.
- [8] BEDNÁŘOVÁ, Jaroslava. *Herbář, aneb, Od anděliky k žindavě*. Vydání první. V Praze: Fortuna Libri, 2015. ISBN 978-80-7321-943-7.
- [9] KADLÍKOVÁ, Lenka. Bez černý květ. In: *Příroda.cz* [online]. Skalice, c 2004-2017 [cit. 2017-03-24]. ISSN 1801-2787. Dostupné z: http://www.priroda.cz/clanky/foto/bez_cerny_kvet.jpg
- [10] Bez černý plody – bezinky. In: *Zahradacentrum.cz* [online]. c2013 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <http://www.zahrada-centrum.cz/images/illustrations/slider/000961.jpg>
- [11] OPICHAL, František. *Bez černý: sambucus nigra L. : baza čierna : výborná potravina a ještě lepší lék*. [S.l.: s.n., 1973.
- [12] 100% šťáva z černého bezu. In: *Prozdravi.cz* [online]. Chrudim, c2017 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <https://www.prozdravi.cz/photos/z/v/05/cerny-bez-100-stava-z-cerneho-bezu-500-ml.jpg>
- [13] SIDOR, Andrzej a Anna GRAMZA-MICHAŁOWSKA. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Functional Foods*. 2015, 18(), 941–958. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614002400>
- [14] VULIC, Jelena, Ljubo VRACAR a Zdravko SUMIC. Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. *Acta periodica technologica*. 2008, (39), 85-90. DOI: 10.2298/APT0839085V. ISSN 1450-7188. Dostupné také z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1450-71880839085V>
- [15] ERCISLI, Sezai, Murat TOSUN a Mustafa AKBULUT. Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine* [online]. 2009, 5(20), 320- [cit. 2017-04-10].

DOI: 10.4103/0973-1296.58153. ISSN 0973-1296. Dostupné z:
<http://www.phcog.com/text.asp?2009/5/20/320/58153>

- [16] VEBERIC, R, J JAKOPIC, F STAMPAR a V SCHMITZER. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009, 114(2), 511-515. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.080. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608011710>
- [17] BRADY, John W. *Introductory food chemistry*. 1st pub. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 2013. ISBN 978-0-8014-5075-4.
- [18] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5902-X.
- [19] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [20] OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1884-5.
- [21] HRSTKA, Miroslav a Lenka SOMROVÁ. *Praktikum z analytické chemie potravin*. Brno, 2013. E-learning VUT v Brně.
- [22] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [23] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravin: cvičenie*. 2. vyd. Bratislava: STU, 1991. ISBN 80-227-0398-2.
- [24] LEWIN, Sherry. *Vitamin C: its molecular biology and medical potential*. New York: Academic Press, 1976. ISBN 01-244-6350-9.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CGE	ekvivalent cyanidin 3-glukosidu
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
DW	suchá váha
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Tabulky naměřených hodnot	43
Příloha 2: Grafy	46

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulky naměřených hodnot

Tabulka 13: Hmotnosti materiálu pro stanovení sušiny

	navážka bezinek (g)		
	miska 1	miska 2	miska 3
před vysušením	8,9877	7,3586	8,1562
po vysušení	1,6549	1,3912	1,5212

Tabulka 14: Průměrné hodnoty absorbance při stanovení anthokyanů v extraktech (rozpouštědlo destilovaná voda)

	$A_{510 \text{ nm}}$		$A_{700 \text{ nm}}$		
doba extrakce (h)	pH 1	pH 4,5	pH 1	pH 4,5	faktor zředění
1	0,184	0,028	0,003	0,001	11
2	0,226	0,034	0,004	0,001	
3	0,258	0,040	0,003	0,005	
4	0,311	0,046	0,004	0,005	
5	0,354	0,055	0,005	0,005	
6	0,169	0,046	0,003	0,003	20
7	0,192	0,034	0,002	0,003	
8	0,219	0,038	0,002	0,003	
9	0,225	0,039	0,001	0,002	
10	0,232	0,038	0,002	0,003	
11	0,247	0,042	0,003	0,002	
12	0,260	0,043	0,003	0,003	
13	0,267	0,044	0,002	0,003	
14	0,267	0,045	0,003	0,002	

Tabulka 15: Průměrné hodnoty absorbance pro stanovení anthokyanů v extraktech (rozpouštěcí směs voda:ethanol 1:1)

doba extrakce (h)	$A_{510\text{ nm}}$		$A_{700\text{ nm}}$		faktor zředění
	pH 1	pH 4,5	pH 1	pH 4,5	
1	0,173	0,031	0,001	0,001	20
2	0,220	0,035	0,001	0,001	
3	0,245	0,040	0,001	0,001	
4	0,331	0,052	0,000	0,001	
5	0,380	0,059	0,001	0,001	
6	0,179	0,027	0,004	0,002	40
7	0,207	0,032	0,008	0,002	
8	0,216	0,034	0,009	0,008	
9	0,236	0,040	0,010	0,005	
10	0,244	0,042	0,010	0,003	
11	0,262	0,039	0,002	0,002	
12	0,240	0,037	0,002	0,001	
13	0,282	0,038	0,000	0,002	
14	0,298	0,044	0,002	0,003	

Tabulka 16: Průměrné hodnoty indexu lomu pro stanovení refraktometrické sušiny

vzorek	index lomu
extrakt 13 h	1,3633
extrakt 14 h	1,3637
extrakt 15 h	1,3643
šťáva	1,3539
kompot	1,3562

Tabulka 17: Průměrné hodnoty pro standardizaci odměrného roztoku manganistanu draselného ($c = 0,02\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na kyselinu šťavelovou

$m_{\text{kys. šťav.}} (\text{g})$	$V \text{ KMnO}_4 (\text{ml})$
0,6374	9,57

Tabulka 18: Průměrné hodnoty naměřené při stanovení cukrů (hmotnost sraženiny oxidu měďného pro stanovení gravimetricky a spotřeba manganistanu draselného ($c = 0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) pro stanovení podle Berthrandu

vzorek	m Cu ₂ O (mg)	V KMnO ₄ (ml)
extrakt 13 h	14,8	1,0
extrakt 14 h	15,1	1,0
extrakt 15 h	15,5	1,0
šťáva	36,9	2,5
kompot	41,2	2,8

Tabulka 19: Průměrné hodnoty pro standardizaci odměrného roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na kyselinu šťavelovou

m _{kys. šťav.} (g)	V NaOH (ml)
1,2640	7,88

Tabulka 20: Průměrné hodnoty spotřeby NaOH ($c = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při titraci vzorků pro stanovení obsahu kyselin

vzorek	pH	V NaOH (ml)	faktor zředění
extrakt 13 h	4,05	0,37	10
extrakt 14 h	4,04	0,38	
extrakt 15 h	4,04	0,40	
šťáva	3,74	15,67	-
kompot	4,16	11,20	

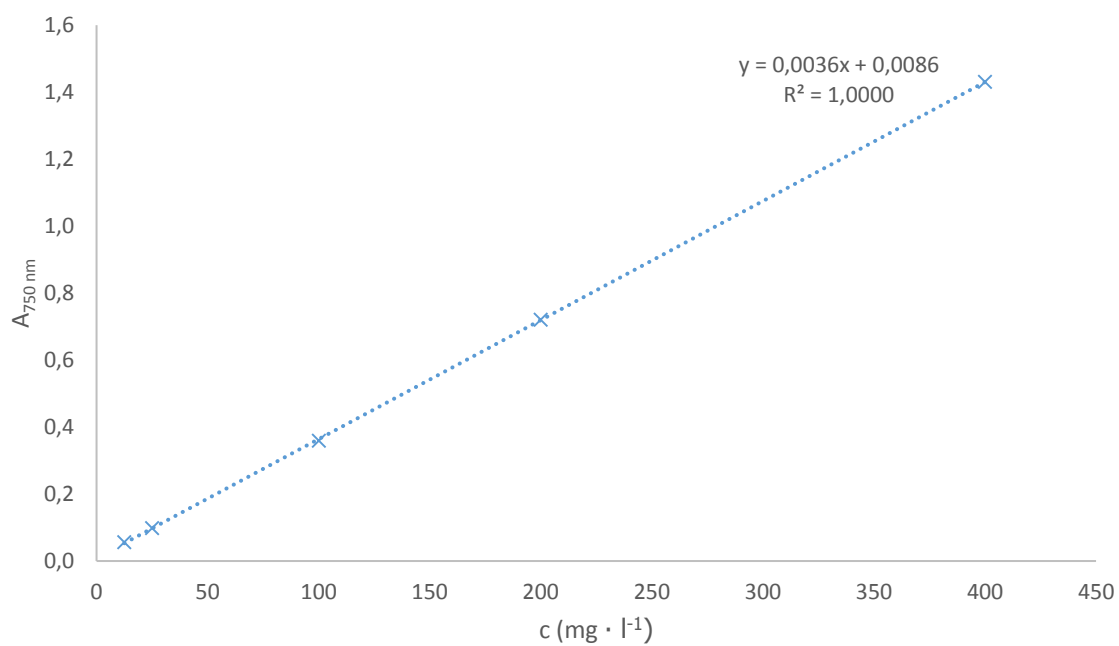
Tabulka 21: Průměrné hodnoty absorbancí pro stanovení celkových anthokyanů

vzorek	A _{510 nm}		A _{700 nm}		faktor zředění
	pH 1	pH 4,5	pH 1	pH 4,5	
extrakt 13 h	0,279	0,035	0,000	0,002	40
extrakt 14 h	0,294	0,037	0,001	0,001	
extrakt 15 h	0,309	0,039	0,001	0,001	
šťáva	0,166	0,021	0,001	0,001	100
kompot	0,178	0,054	0,014	0,014	

Tabulka 22: Průměrné hodnoty absorbancí pro stanovení celkových fenolických látek

vzorek	A _{750 nm}	faktor zředění
extrakt 13 h	0,244	40
extrakt 14 h	0,256	
extrakt 15 h	0,265	
šťáva	0,206	100
kompot	0,176	

Příloha 2: Grafy



Graf 8: Kalibrační křivka kyseliny gallové